



莽草酸脱氢酶活性检测试剂盒

SD Assay Kit

微量法

产品编号：AK469M

产品规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES469	100mL×1 瓶	4℃保存；
AK469-A	25mL×1 瓶	4℃保存；
AK469-B	粉剂×2 瓶	-20℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：莽草酸途径是存在于植物、真菌和微生物中的一条重要的代谢途径，莽草酸脱氢酶（Shikimate dehydrogenase, SD）是莽草酸合成途径中的关键酶。

原理：莽草酸脱氢酶催化莽草酸和 NADP 产生 NADPH，检测 340nm 下的吸光值增加速率来表示 SD 活性。

自备用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：ES469 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES469），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：ES469 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES469），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 准备 96 孔 UV 板一块（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板）。
- 样本测定
 - 在 AK469-B 中加入 10mL AK469-A 充分溶解混匀，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min，**现配现用**。
 - 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
AK469-B	190
混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 5min20s 后的吸光值 A2， 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

SD 活性计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 643 \times \Delta A \div Cpr$$

2. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 1286 \times \Delta A \div Cpr$$

2. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。